

Anyagcsere betegségek vizsgálata tandem tömegspektrometriával

Dr. Karg Eszter, Dr. Kapus Katalin, Dr. Rácz Katalin, Dr. Katona Márta, Dr. Várkonyi Ágnes, Dr. László Aranka, Dr. Wittmann Gyula, Dr. Túri Sándor

SZTE ÁOK Gyermekgyógyászati Klinika és Gyermekegészségügyi Központ, Szeged

Az anyagcsere veleszületett zavarai nem tartoznak a gyakori betegségek közé, azonban az érintett gyermekben súlyos fejlődési zavarok, egészségkárosodás kialakulásához vezethetnek. Az aminosavak, zsírsavak, vagy organikus savak lebontásához szükséges enzimek hiánya, ill. elégtelen működése az említett anyagok felszaporodását eredményezi. Ezek következtében mentális és szomatikus retardáció, vagy akár halálhoz vezető tünetek (pl. metabolikus krízis, májelégtelenség, szívizom károsodás, encephalopathia, stb) léphetnek fel.

A zsírsav oxidációs zavarok és organikus aciduriák kimutatása a szabad karnitin és acilkarnitin koncentrációk vérmintából történő meghatározása, az aminoacidopátiák diagnosztizálása az aminosav szintek mérése alapján lehetséges. A tandem tömegspektrometria (tandem mass spectrometry, MS/MS) egyetlen vérminta aminosav és acilkarnitin szintjeinek meghatározásával 20–30 anyagcsere betegség kimutatását teszi lehetővé egy 2–3 perces mérés alatt.

Millington és munkatársai 1990-ben javasolták az MS/MS módszer bevezetését az újszülöttkori szűrés céljaira, s a kilencvenes évek közepén már el is indultak az újszülöttkori szűrőprogramok az USA és Ausztrália néhány központjában. A vizsgálatok tapasztalatait összefoglaló közlemények szerint a tömegspektrometriával szűrhető megbetegedések összesített incidenciája (a fenilketonuriát is beleértve) 1:3 400–1:4 700

között van. Közülük a középplancú acil-CoA dehidrogenáz hiány (MCAD) előfordulása kb. azonos a fenilketonuria gyakoriságával.

A Szegedi Tudományegyetem Gyermekgyógyászati Klinikáján 2004 közepétől végzünk szelektív vizsgálatokat tünetes betegeken és családtagjaikon tandem tömegspektrometriával.

A módszert részben ismert fenilketonuriás betegek ellenőrzésére, ill. a biopterin terheléses teszt hatásának kimutatására használjuk. A fenilketonuria a fenilalanin hidroxiláz enzim csökkent működésének a következménye. Tartós hiperfenilalaninémiát azonban az enzim kofaktorának, a tetrahidrobiopterinnak a hiánya is okozhat. Ezért minden hiperfenilalaninémias gyermekben ki kell zárni a biopterin kofaktor hiányát. Erre az egyik lehetőség a biopterin terheléses teszt elvégzése. Nagy mennyiségben biopterint juttatunk a beteg szervezetébe, majd folyamatosan vizsgáljuk a fenilalanin szintet. Ha a fenilalanin szint a terhelés hatására normalizálódik, biopterin hiánnyal állunk szemben. A fenilketonurias gyermekek fenilalanin szintje a terhelés hatására csökkenhet, de soha meg sem közelíti a normál szintet.

A fenilalanin szint meghatározásokon kívül 2004. júniusa és 2005. szeptembere között 796 vérminta tömegspektrometriás aminosav és acilkarnitin analízisét végeztük el diagnosztikus célból. A betegek átlagéletkora 7,59 év (1 nap – 36 év) volt, a férfi:nő aránya 1,5:1. (A minták értékelését nagy mértékben befolyásolja a beteg kora. Születés után 1 héttel már más a normál tartomány, mint közvetlenül születés után. Az értékek a további hónapokban sőt, években is jelentősen változnak, emelkedés és csökkenés is előfordul a különböző metabolit szintekben).

A vizsgálatokat a betegeknél fennálló, valamely anyagcsere-betegségre jellemző klinikai és laboratóriumi tünet miatt kérték intézetünkől. A vizsgálatkérő lapokon jelzett tünetek a következők voltak: mentális és szomatikus retardáció, hypotonia, spaszticitás, ptosis, mozgászavar, etetési nehézségek, hányás, hasmenés, alvási problémák, ismétlődő apnoék, ismeretlen eredetű bőrtünetek, elhúzódó icterus, emelkedett májfunkciós értékek, hypoglycaemia, hyperammonaemia, metabolikus acidózis, illetve egy esetben a családi anamnézisben szereplő hirtelen csecsemőhalál.

A 796 mintából 143 beteg egy vagy több aminosav vagy acilkarnitin értéke haladta meg a normál tartomány felső határának tartott $x + 4$ SD értéket. Közülük az adott betegség fennállását valószínűsítő, a nemzetközi irodalomban megadott kóros határértéket 30 beteg egy vagy több metabolit szintje haladta meg. Azt a 113 értéket, mely 4 SD feletti, de a kóros határt el nem érő szintet mutatott, az ún. Szürke zónába soroljuk. Ezeknek az értékeknek a jelentősége ma még nem ismert. Feltételezhető, hogy ilyen mértékű eltéréseket a betegségekért felelős mutációkat heterozigóta formában hordozó egyedek mutatnak. Középláncú acil CoA dehidrogenáz hiány esetén megfigyelték, hogy a 985A>G mutációra heterozigóták valóban a normál kontrolloknál magasabb, de a kórkép enyhe formájában szenvedő betegeknel is alacsonyabb oktanoilkarnitin szinteket mutatnak. További magyarázat lehet a jelenségre olyan, eddig fel nem derített mutációk létezése, melyek az enzimek működését csak enyhébb mértékben befolyásolják, s melyeknél a laboratóriumi értékek változását nem követi a klinikai tünetek párhuzamos megjelenése.

A tömegspektrometriás aminosav és acilkarnitin meghatározások bizonyos kórképek esetén pl. fenilketonúria, Jávorfaszörp betegség, elegendőek a diagnózis egyértelmű felállításához.. A legtöbb esetben azonban további vizsgálatokra (vizelet organikus sav meghatározás, fibroblaszt/limfocita enzim aktivitás mérés, DNS mutáció vizsgálat) van szükség a betegség fennállásának igazolására. Ennek oka egyrészt az, hogy az MS/MS módszer specifitása nem elég nagy, s bizonyos metabolitok között, pl. butirilkarnitin és izobutirilkarnitin, nem tud különbséget tenni. Pedig a két metabolit különböző anyagcsere betegségek jelző vegyülete: a butirilkarnitin emelkedés a rövidláncú acil CoA dehidrogenáz hiány következtében lép fel, s a zsírsav béta oxidáció zavarra utal; az izobutirilkarnitin az izobutiril CoA dehidrogenáz hiány következtében szaporodik fel, mely a valin katabolizmus zavarai. Másrészt egy adott metabolit emelkedése több, különböző betegség esetén is előfordulhat, pl. a propionilkarnitin emelkedése a következő zavarok elkülönítését igényli: propionil CoA dehidrogenáz hiány, metilmalonil CoA dehidrogenáz hiány, a kobalamin anyagcsere zavarai, valamint B12 hiányos táplálkozás.

A továbbiakban 4 betegünk esetét ismertetjük, melyekkel a szelektív szűrés jelentőségét szeretnénk alátámasztani.

Esetismertetések

1. beteg:

N. Zs. 3 hónapos kisfiú tünetei csecsemőkorban kezdődtek ismétlődő hányásokkal. Klinikánkra etetési problémák, dystrophia, generalizált izomhypotonia, arcra, nyakra és a glutealis régióra kiterjedő dermatitis, valamint infekcióra utaló súlyos tünetek miatt került felvételre. A laboratóriumi vizsgálatok során emelkedett szérum ammónia szintet, ill. metabolikus acidózist észleltünk. Az MS/MS vizsgálat mérsékelten emelkedett propionilkarnitin szintet mutatott (7,7 $\mu\text{mol/L}$), mely metilmalonsav, vagy propionsav acidózis gyanúját vetette fel. A vizelet organikus sav analízis enyhén emelkedett metilmalonsav ürítést mutatott, amely alapján metilmalonsav acidemia igazolódott.

A betegségnek megfelelően karnitinpótlást, natrium-benzoicum adását és speciális diétát indítottunk 0,6 g/tskg/nap fehérje-megszorítással. A kezelésnek köszönhetően infekciója szanálódott, állapota fokozatosan javult, hányásai megszűntek, súlyfejlődése megindult. A három hetes kezelést követően elvégzett kontroll vizsgálatok során a vér propionilkarnitin szintje a normális tartományban volt (1,4–2,6 $\mu\text{mol/L}$), a vizelet organikus sav analízise kórjelző eltérést már nem mutatott. Jelenleg a kezelés mellett tünet- és panaszmentes.

2. beteg:

K. A. kislány másfél éves korában került felvételre klinikánkra dystrophia, meteorizmus, hasmenés miatt tejallergia gyanújával. A felvételét követően észlelt magas májfunkciós értékek, extrém mértékben emelkedett alpha foetoprotein szint, csökkent máj szintetikus kapacitás (K-vitaminpótlásra sem rendeződő alacsony prothrombin szint), hepatosplenomegalia, ill. tubulopathia miatt 1-es típusú tyrosinaemia gyanúja merült fel. A vérmintájának MS/MS és kromatográfiás (HPLC)módszerrel történt aminosav analízise jelentősen emelkedett tirozin szintet (454 $\mu\text{mol/L}$) talált, ill. a vizeletben jelentősen emelkedett tirozin- és fumarilaceto-acetát ürítés igazolt.

Kezelését speciális, alacsony fehérjetartalmú, tirozin- és fenilalanin-mentes tápszerrel, és a hepatocelluláris karcinóma prevenciójára NTBG antimetabolit gyógyszerrel azonnal elkezdjük. Jelenleg 3 évesen panaszmentes, májfunkciós értékei közel normálisak, tirozin szintje (195 $\mu\text{mol/L}$) normál tartományban van, alpha-foetoprotein szintje csökkent.

3. beteg:

P. B. kisfiú édesanyja 5. terhességéből született a 33. gesztációs héten 2450 g születési súllyal. Anamnézise szerint szülei a megelőző 12 év során öt gyermeket veszítettek el 5 órás és 3 hónapos életkor között súlyos metabolikus acidózis, ill. organikus acidúria tünetei miatt. Az ötödik gyermek esetében a második napon női tejjel történt táplálás után encephalopathiás tünetek jelentkeztek. A vizelet organikus sav analízise emelkedett 3-hidroxi-metabolit és propionilglycin szintet mutatott, és propionsav aciduria fennállását igazolta. Megfelelő diéta beállítása után a csecsemő otthonába távozott, azonban 3 hónapos korában intercurrents fertőzés kapcsán exitált.

A következő terhesség során korionboholy biopsziás mintából prenatalis enzimdiagnosztika történt, azonban a kis számú sejt miatt a vizsgálat nem volt informatív. P. B. születése terciér szülészeti intézetben történt, majd azonnal átszállították klinikánk újszülött intenzív osztályára. Az eseménydús perinatális időszak (bal oldali pneumothorax miatt thoracocentesis, respirációs distress szindróma, gépi lélegeztetés 9 napig) alatt, a fokozatos étrendi protein bevezetés során sem jelentkezett idegrendszeri és bőrtünet, vagy metabolikus acidózis. Az első életnaptól kezdődve rendszeresen végzett MS/MS vizsgálatok normál acilkarnitin (propionilkarnitin: 0,22–2,63 $\mu\text{mol/L}$) szinteket mutattak, a propionsav acidúria fennállását nem igazolták.

Otthonába 36 napos életkorban engedték. Azóta is panaszmentes, acilkarnitin értékei továbbra (2,30 – 4,41 $\mu\text{mol/L}$) sem mutatnak kóros eltérést. A közeljövőben tervezzük a család a genetikai vizsgálatát a mutációs eltérés kimutatása céljából.

4. beteg:

F. T. koraszülött leány a 28. gesztációs héten, 1000 g születési súllyal született Gemini-B tagként. Ikertestvére néhány órási életkorban sepsisben exitált. F. T.-t születésétől fogva klinikánkon kezeltük respirációs distress szindróma, necrotizáló enterocolitis, ismétlődő septikus állapotok miatt. Két hónapos koráig súlyos állapota miatt csak parenteralis táplálással tudtuk energia-bevitelét fedezni. Az enterális táplálás megkezdését követően is fennálló elhúzódó icterus, emelkedett májfunkciós paraméterei, ismétlődő hypoglycaemiái háttérében az egyéb okok kizárását követően anyagcsere betegség gyanúja merült fel. Az aminosav- és acilkarnitin analízis 3 hónapos korában történt, mely az igen alacsony szabad karnitin

(C0: 3,9 $\mu\text{mol/L}$) és acetilkarnitin (C2: 3,1 $\mu\text{mol/L}$) szintjei alapján karnitin transzport defectust valószínűsített. Karnitin pótlást kezdtünk, melynek köszönhetően 3 hetes kezelés után a karnitin szintjei normalizálódtak (C0: 47 $\mu\text{mol/L}$, C2: 22 $\mu\text{mol/L}$), sárgasága, májfunkciós értékei, fokozatosan csökkentek, majd normalizálódtak.

Az édesanyjánál is történt MS/MS vizsgálat, mellyel a normál tartomány alsó határán lévő karnitin szinteket igazolt (C0: 10 $\mu\text{mol/L}$, C2: 7 $\mu\text{mol/L}$). A betegség kizárása vagy igazolása érdekében az édesanyjánál további vizsgálatok elvégzését tervezzük. A betegség fennállása esetén az anya gondozásba vétele ill. karnitin szupplementációja is indokolt lehet.

Az eset bemutatásokkal a szelektív vizsgálatok jelentőségét próbáltuk alátámasztani. Amennyiben a vizsgálat és a diagnózis felállítása a tünetek megjelenése után, de az irreverzibilis károsodások kialakulása előtt történik, az időben bevezetett kezeléssel sok esetben megakadályozható vagy lassítható a betegség progressziója. A családvizsgálat fontosságát bizonyítja, hogy a kóros mutációt hordozó, de még klinikai tüneteket nem mutató betegek kiszűrhetők és gondozásba vehetők. Másrészt a családban előforduló ismert betegség esetén lehetőség nyílik az újszülöttek születést követő szelektív szűrővizsgálatára. A diagnózis felállítása azonban csak szükséges, de nem elégséges feltétel, s a kezelés hatékonysága nem minden esetben elegendő az anyagcsere betegségek súlyos következményeinek a kivédésére. Végül meg kell említenünk, hogy az eddig vizsgált betegink döntő többsége az MS/MS mérések elvégzésekor már irreverzibilis mentális és/vagy szomatikus károsodás állapotában volt.

Összefoglalva, a tandem tömegspektrometria egyedülálló analitikai technológia, mely nem invazív módon, egyetlen beszárított vérmintából párhuzamosan több anyagcsere-betegség gyors szűrésére alkalmas. E diagnosztikus módszer azonban csak akkor válhat igazán hatékony eszközzé a kezünkben, ha alkalmazása időben, az irreverzibilis károsodások kialakulása előtt történik. Mindezek miatt az igazi célunk a tandem tömegspektrometria újszülöttkori szűrővizsgálatként való bevezetése.